植 物 分 类 学 报 38(3):211~217(2000)
Acta Phytotaxonomica Sinica

山羊草属异源多倍体物种核 rDNA ITS 区的进化

[1]王 超 [1]王建波* [2]施苏华 [3]钟 扬
[1](武汉大学生命科学学院 武汉 430072) [2](中山大学生命科学学院 广州 510275)
[3](中国科学院武汉植物研究所 武汉 430074)

Evolution of Internal Transcribed Spacer Region of Nuclear Ribosomal DNA in Allopolyploids of *Aegilops*

[1] WANG Chao [1] WANG Jian-Bo* [2] SHI Su-Hua [3] ZHONG Yang
[1](*College of Life Sciences, Wuhan University*, Wuhan 430072) [2](*College of Life Sciences, Zhongshan University*, Guangzhou 510275)
[3](*Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences*, Wuhan 430074)

Abstract Hybridization with subsequent polyploidy is a prominent process in evolution of higher plants, but few data address the evolution of homeologous sequences after polyploidy. The internal transcribed spacer (ITS) of nuclear ribosomal DNA (nrDNA) from eleven allopolyploid species in *Aegilops* was investigated by PCR amplification and direct sequencing. The sequences obtained were used to study the evolution of ITS region in allopolyploid species. The length of ITS region varied from 599 to 606 bp and the number of variable sites was 93, i.e. 51 and 42 for ITS1 and ITS2 respectively. Some polymorphic sites were observed in polyploid species, and this indicated that the ancestral sequences had not been homogenized completely by concerted evolution. Distance matrix analysis of diploid and polyploid species by neighbor-joining method, using *Triticum monococcum* as outgroup, resulted in well-resolved neighbor-joining tree indicating that the ITS regions of UUMM and UUSS genome (sect. *Vertebrata*) were homogenizing toward those of UU ancestal genome. This result is in agreement with the results of ctyogenetics of *Aegilops*. On the other hand, the neighbor-joining tree including the D-genome group species (sect. *Cylindropyrum* and sect. *Polyeides*) comprised three clades (CC-DDCC, UU-DDMM-DDMMSS-DDMMUU and MM-DDM^{v}M^v), which suggested that concerted evolution was homogenizing the ITS region of the polyploid derivatives to either of their ancestors.

Key words *Aegilops*; Allopolyploid; ITS sequence; Evolution

摘要 本文测定了山羊草属 *Aegilops* 3个组中异源多倍体物种的核 rDNA ITS 区序列,并用邻接法进行了聚类分析。结果表明,多倍体物种的 ITS 区序列长度为 559~606 bp,其中 ITS1、ITS2 分别有变异位点 51、42个,且存在多态位点。多倍体种均与各自的某一祖先种构成稳定分支,说明在杂交-多倍化后,这些多倍体的 ITS 区在同步进化的作用下已向着其某一祖先种的 ITS 区进化。对于 sect. *Vertebrata* 的异源多倍体物种来说,其 ITS 区主要向其祖先种 *Ae. umbellulata* (UU) 的 ITS 区进化,这与山羊草属的细胞遗传学研究结果基本一致。在 sect. *Cylindropyrum* 和 sect. *Polyeides* 中,*Ae. cylindrica*(CCDD)朝着 *Ae. caudata*(CC)进化; *Ae. ventricosa*(DDM^{v}M^v)朝着 *Ae. comosa* (MM)进化; *Ae. vavilovii*(DDMMSS)朝着 *Ae. crassa*(DDMM)进化。

关键词 山羊草属; 异源多倍体; ITS 区序列; 进化

1999-07-07 收稿,1999-10-28 收修改稿。
基金项目:国家自然科学基金(39770056)和武汉大学青年骨干教师基金资助项目。
Supported by Natural Science Foundation of China (39770056) and Young Teacher Foundation of Wuhan University.
* 通讯联系人。Author for correspondence.

在高等植物的进化过程中,杂交和多倍化是一种极为重要的进化方式,约 70% 的被子植物在进化历史上曾经历过多倍化(Masterson 1994),因此,要理解植物的进化就必须对杂交和多倍化有深入的研究。杂交和多倍化的直接结果是曾经独立进化的不同基因组融合到一个细胞核内,且基因组数目成倍增加,但经历这样的变化之后基因组以及特定的基因片段如何进化,这方面的研究还很少。目前人们主要从两个角度来研究上述问题,一方面是了解多倍体整个基因组的变化(Song *et al*. 1995),另一方面是研究某一基因在多倍体形成前后的变化(Ainouche & Bayer 1997, Cronn & Wendel 1996, Wendel *et al*. 1995)。后一种方法目前仅有的几篇报道研究的主要是核 rRNA 基因(即核 rDNA),尤其是 18S-26S rDNA 的内转录间隔区,即 ITS 区(Sang *et al*. 1995, Wendel *et al*. 1995)。与其他重复序列相似,ITS 区序列以同步进化(concerted evolution)的特定方式进化,这种进化方式受杂交和多倍化等多种因素的影响(Dover 1994, Hillis *et al*. 1991)。目前的研究表明多倍体内 ITS 区序列的进化十分复杂,祖先的 ITS 区序列在多倍体内可能共存(Waters & Schaal 1996, Sang *et al*. 1995),也可能朝着某一祖先的序列进化(Wendel *et al*. 1995)。然而,这方面的证据还很少,需要作进一步研究。

山羊草属 *Aegilops* 是禾本科 Poaceae 中与小麦属 *Triticum* 关系密切的一个属,杂交和多倍化在该属的进化过程中起着重要作用,6 个组中有 3 个组包含多倍体物种。有关该属多倍体基因组的进化,Kimber & Zhao(1983)曾用细胞遗传学方法研究了该属 sect. *Vertebrata*(含 DD 基因组)的类群,发现在这些多倍体物种中,有的 DD 基因组基本没有变化,有的只稍有变化,而有的却有很大的变化。对于该属 sect. *Polyeides*(含 UU 基因组)的多倍体基因组的进化,Feldman(1965)提出了轴-分化(pivotal-differential)假说,认为这些多倍体物种在进化过程中,UU 基因组基本保持不变,而另一基因组(MM 或 SS)则会被不同程度的修饰,从而使整个基因组发生变化。但是,这一假说仅在细胞学上得到一些证据(Kimber & Yen 1989),有必要在分子水平上对它们进行更深入的探讨。

目前,核 rDNA 的 ITS 区序列已成为植物系统学中研究低等级分类群系统发育的有效工具之一,并已成为分子进化的重要标记(王建波等 1999, 汪小全 洪德元 1997, Baldwin *et al*. 1995)。因此,对杂交-多倍化后 ITS 区如何进化的研究在植物分子系统学理论方面就显得尤其重要。本文以山羊草属的系列二倍体、四倍体、六倍体物种为材料,通过测定核 rDNA 的 ITS 区序列来探讨多倍体复合体 ITS 区的分子进化。

1 材料和方法

1.1 材料

所用材料包括山羊草属 3 个组的 11 个多倍体种及 6 个相关二倍体祖先种(表 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 剪取长 8~10 cm 的幼苗,采用 CTAB 法提取总 DNA,直接用于 PCR 扩增。

1.2.2 ITS 区片段的扩增与纯化 PCR 反应过程及所用引物参照 Wen & Zimmer (1996), PCR 扩增产物采用 QIAGEN 公司的 PCR 产物纯化试剂盒进行纯化。

1.2.3 序列测定 采用双脱氧链终止法,以 α-^{35}S-dATP 为放射性标记,操作按 T_7 sequenc-

ing Kit (Pharmacia 公司) 进行,分别采用引物 N18L18、C5.8S、ITS 3、ITS 4(Wen & Zimmer 1996),从两个方向进行手工测序,得到整个 ITS 区序列。

表 1 实验材料及其主要特征

Table 1 Materials and their major characters used in this study

Species 种名	Abbreviation 缩写	Genome 基因组	Taxonomic position 分类学地位	Source and voucher 来源及凭证标本	Genbank No. GenBank 登录号
Aegilops searsii	SEA	S^sS^s	Sect. *Sitopsis*	KU[a] 4-6	AF149194
Ae. comosa	COM	MM	Sect. *Comopyrum*	ICGR[b] Y258	AF149198
Ae. caudata	CAU	CC	Sect. *Cylindropyrum*	ICGR Y45	AF149199
Ae. cylindrica	CYL	CCDD	Sect. *Cylindropyrum*	ICGR Y9	AF156993
Ae. umbellulata	UMB	UU	Sect. *Polyeides*	ICGR Y139	AF149197
Ae. kotschyi	KOT	UUSS	Sect. *Polyeides*	ICGR Ae19	AF157002
Ae. variabilis	VAR	UUSS	Sect. *Polyeides*	ICGR Y88	AF156996
Ae. columnaris	COL	UUMM	Sect. *Polyeides*	ICGR Ae10	AF156997
Ae. biuncialis	BIU	UUMM	Sect. *Polyeides*	ICGR Ae52	AF157003
Ae. ovata	OVA	UUMM	Sect. *Polyeides*	ICGR Y77	AF156998
Ae. triaristata	TRA	UUMM	Sect. *Polyeides*	ICGR Ae58	AF157004
Ae. squarrosa	SQU	DD	Sect. *Vertebrata*	ICGR Ae37	AF149193
Ae. crassa	CRA	DDMM	Sect. *Vertebrata*	ICGR Y229	AF157000
Ae. juvenalis	JUV	DDMMUU	Sect. *Vertebrata*	ICGR Ae16	AF157001
Ae. vavilovii	VAV	DDMMSS	Sect. *Vertebrata*	KU 21-1	AF156999
Ae. ventricosa	VEN	DDM^vM^v	Sect. *Vertebrata*	ICGR Y159	AF156995
Triticum monococcum	CMO	AA		Hsiao *et al*. (1995)	L11581

a: KU 指日本京都大学 b: ICGR 指中国农业科学院品种资源研究所。

a: Plant Germ-plasm Institute, Faculty of Agriculture, Kyoto University, Japan.

b: Institute of Germplasm Resource, Chinese Academy of Agricultural Science.

1.2.4 ITS 区序列分析 所测序列采用 Clustal X 程序(Thompson *et al*. 1997)进行对位排列。用 PHYLIP3.5c 软件包(Felsenstein 1997) 进行统计分析和聚类分析。用 Kimura 双参数模型(Kimura 1980) 计算各序列间分化距离,采用邻接法(neighbor-joining method)获得分子系统树,并用自展法(bootstrap)进行检测,自展数据集为 1000 次。与山羊草属关系最近的是小麦属,因此在聚类分析中选择该属的二倍体种一粒小麦(*Crithidium monococcum*,即 *Triticum monococcum*)为外类群, 用 NEIGBOR 程序进行运算。为了避免因杂交-多倍化而引起的聚类分析结果的误差,参照雀麦属 *Bromus* 及棉属 *Gossypium* 异源多倍体分子进化研究方法(Ainouche & Bayer 1997, Wendel *et al*. 1995),根据分类学地位和基因组的相互关系,在聚类分析时将多倍体分为含 UU 基因组的多倍体(均属 sect. *Vertebrata*)和 DD 基因组的多倍体(属 sect. *Cylindropyrum* 和 sect. *Polyeides*),再与其相应的二倍体祖先种一起进行分析,得到含二倍体-多倍体物种的基因树(图 1,图 2)。

2 实验结果

2.1 ITS 区序列的长度及变异

本研究的山羊草属二倍体、多倍体物种 ITS 区序列已进入 GenBank,登录号见表 1。

因为所有的序列长度相似,所以在排序时只需插入少数空格。除了在192~196 bp处有一个4碱基缺失外,其余的大部分为单碱基缺失(ITS1有5个,ITS2有3个)。ITS1的长度(排序长度230 bp,绝对长度221~226 bp)比雀麦属 *Bromus*、小麦属 *Triticum* 的稍长(Ainouche & Bayer 1997, Hsiao *et al*. 1995),但却具典型的禾本科植物ITS区的G+C含量(60.6%~63.1%)。对于ITS2,在G+C含量(61.8%~63.9%)和长度(排序长度217 bp,绝对长度214~217 bp)等方面都与其他禾本科植物相似。5.8S nrDNA的序列很保守,长度均为164 bp,仅在 *Ae*. *kotschyi* 和 *Ae*. *variabilis* 中存在着1个碱基的变异。除去缺失位点,ITS1的变异位点与ITS2的变异位点分别为51和42个;其中多态位点共有39个(ITS1,23;ITS2,16),这表明同步进化的力量还没有使山羊草属多倍体植物的ITS区序列完全一致化。

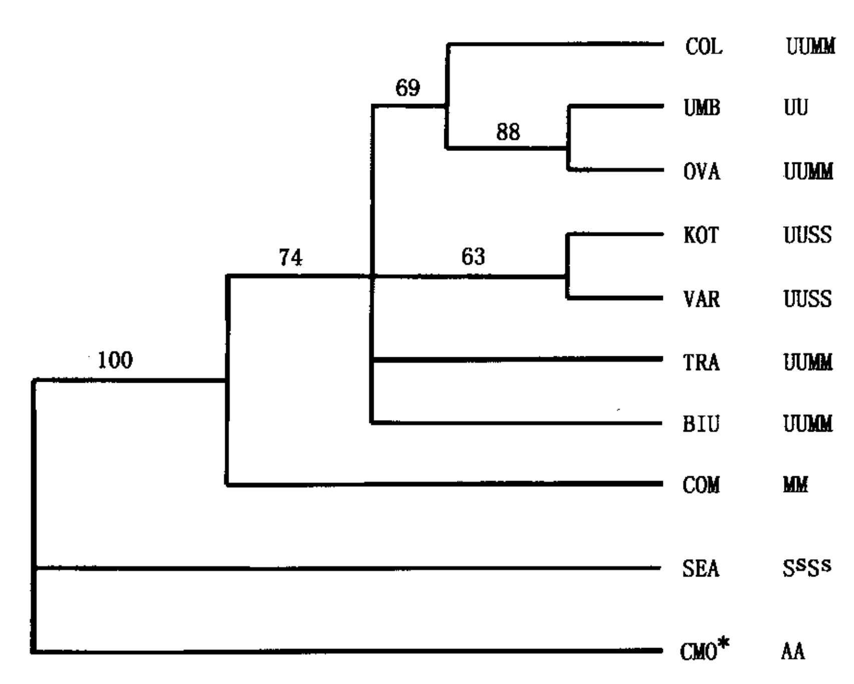


图1 用sect. *Vertebrata* 的多倍体和其祖先二倍体的ITS区序列构建的邻接树
分支上的数字是1000次重复抽样检测的bootstrap值,*表示外类群,分类群缩写同表1,种名缩写后的符号为基因组符号。
Fig.1 The neighbor-joining tree considering sect. *Vertebrata* polyploid taxa and their ancestal diploid species of *Aegilops*. Numbers above branches are bootstrap values(%) of 1000 replications, asterisk designates outgroup and species abbreviations are the same as Table 1 followed the genomic symbols.

2.2 聚类分析

用邻接法计算获得的50%多数一致树表明,在sect. *Vertebrata* 中,基因组分别为UUMM和UUSS的多倍体物种在邻接树中均与具UU基因组的二倍体祖先种聚在一起(图1)。在含有DD基因组多倍体物种的邻接树中,*Ae*. *cylindrica*(CCDD)与 *Ae*. *caudata* (CC)聚成一支,*Ae*. *ventricosa*(DDM^vM^v)与 *Ae*. *comosa* (MM)聚在一起,*Ae*. *vavilovii*(DDMMSS)、*Ae*. *juvenalis*(DDMMUU)则与 *Ae*. *crassa*(DDMM)、*Ae*. *umbellulata* (UU)构成一个分支(图2)。

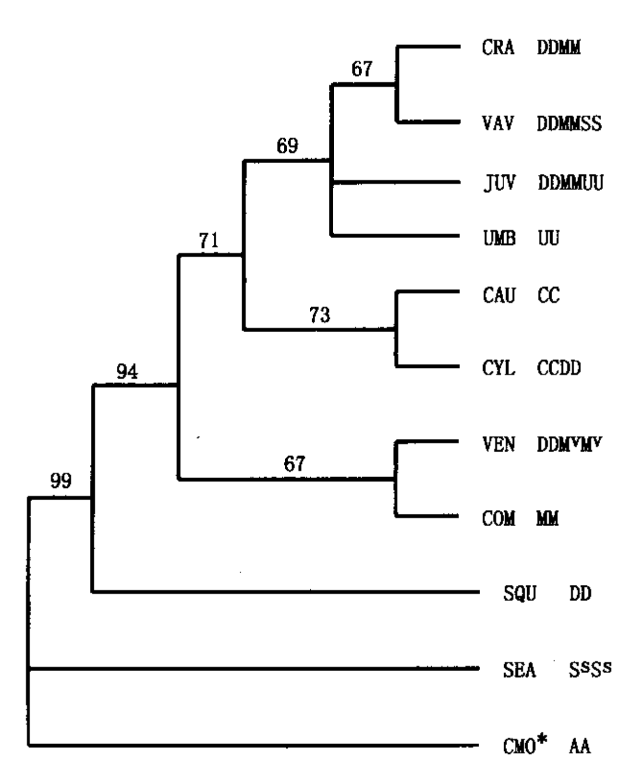


图 2　用含 DD 基因组的多倍体(sect. *Cylindropyrum* 和 sect. *Polyeides*)及其二倍体祖先种的 ITS 区序列构建的邻接树
分支上的数字是 1000 次重复抽样检测的 bootstrap 值，* 表示外类群，分类群缩写同表 1，种名缩写后的符号为基因组符号。

Fig.2　The neighbor-joining tree considering DD-genome polyploid taxa(sect. *Cylindropyrum* and sect. *Polyeides*) and their ancestal diploid species of *Aegilops*. Numbers above branches are bootstrap values(%) of 1000 replications, asterisk designates outgroup and species abbreviations are the same as Table 1 followed the genomic symbols.

3 讨　论

山羊草属多倍体物种均是由二倍体物种杂交-多倍化起源的 (Grant 1981)，因此要研究多倍体的进化就必须先弄清楚二倍体祖先种之间的相互关系。有关该属二倍体物种间的相互关系，在形态学、细胞学和分子水平都已有较详细的研究 (孔秀英等 1999, Sasanuma & Miyasita 1996, Kihara 1954)。同时，该属多倍体基因组的来源也有较明确的结论 (Tsunewaki *et al*. 1976)。在二倍体与多倍体的相互关系上，基因组为 UUMM 的 4 个种 *Ae*. *columnaris*、*Ae*. *biuncialis*、*Ae*. *triaristata* 和 *Ae*. *ovata*，是由 *Ae*. *umbellulata* (UU) 与 *Ae*. *comosa* (MM) 杂交后再多倍化而形成，其中前两种的细胞质由 *Ae*. *umbellulata* 提供，后两种的细胞质来源还不清楚 (Tsunewaki *et al*. 1976)。关于 *Ae*. *kotschyi* (UUSS) 和 *Ae*. *variabilis* (UUSS) 的起源，现在一致认为其 UU 基因组由 *Ae*. *umbellulata* 提供，细胞质由 *Ae*. *searsii* 提供(Zhang & Dvorak 1992, Tsunewaki *et al*. 1976)。在得到的基因树中(图 1)，我们可以看出，所有含 UU 基因组的异源多倍体物种均与 *Ae*. *umbellulata* 祖先种聚在一起，构成一个稳定的分支，表明这些多倍体物种的 ITS 区在朝着 UU 基因组祖先种的 ITS 区方向进化。这种进化方式与棉属 *Gossypium* 异源四倍体物种 ITS 区的进化明显不同。Wendel *et al*.(1995)的研究发现，棉属中基因组同为 AADD 的 5 个四倍体物种，其中 4 个物种的 ITS

区向 DD 基因组方向进化,另一个物种向 AA 基因组进化,因此其进化是双向的。同时,本文的结果与轴-分化(pivotal-differential)假说基本吻合。Feldman(1965)认为山羊草属 sect. *Vertebrata* 中含 UU 基因组的多倍体物种,在进化过程中是以 UU 基因组为轴心进行的,即 UU 基因组基本保持不变,而另外的祖先基因组则会有不同程度的修饰。这一假说在 Kimber & Yen(1989)对减数分裂时染色体配对行为的研究中也得到了证实。

关于 sect. *Polyeides* 中含 DD 基因组的多倍体,有学者(Zhao & Kimber 1984, Kimber & Zhao 1983)根据细胞遗传学的研究结果认为:*Ae. cylindrica* 的 CCDD 基因组和 *Ae. ventricosa* 的 DDM^{v}M^v 基因组中的 DD 基因组与供体 DD 基因组相似,基本没有变化;*Ae. crassa* (DDMM)中的 DD 基因组稍有变化;而 *Ae. vavilovii*(DDMMSS)、*Ae. juvenalis*(DDMMUU)中的 DD 基因组则有较大变化。从本文所得的研究结果来看(图 2),*Ae. cylindrica*(CCDD)与 *Ae. caudata* (CC)聚成一支;*Ae. ventricosa*(DDM^{v}M^v)与 *Ae. comosa* (MM)聚在一起;*Ae. vavilovii*(DDMMSS)、*Ae. juvenalis*(DDMMUU)则与 *Ae. crassa*(DDMM)、*Ae. umbellulata* (UU) 构成一个分支。这说明 *Ae. cylindrica*(CCDD)朝着 *Ae. caudata* (CC)进化;*Ae. ventricosa* (DDM^{v}M^v)朝着 *Ae. comosa* (MM)进化;*Ae. vavilovi*(DDMMSS)朝着 *Ae. crassa*(DDMM)进化。另一方面,在系统树中这些多倍体基因组均未与祖先 DD 基因组聚在一起,表明多倍体中 DD 基因组的 ITS 区已与供体 DD 基因组的 ITS 区发生了一定程度的分化。这与细胞遗传学研究结果不太一致,可能是由于 ITS 区的进化与多倍体基因组整体进化之间存在差异。

致谢 日本京都大学 Taihachi Kawahara 博士和中国农业科学院品种资源研究所杨欣明先生提供实验用种子,在此一并致谢。

参 考 文 献

Ainouche M L, Bayer R J, 1997. On the origins of the tetraploid *Bromus* species (section *Bromus*, Poaceae): insights from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. Genome, 40: 730 ~ 743

Arnheim N, Krystal M, Schmickel R, 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on non-homologous chromosomes in man and apes. Proc Natl Acad Sci USA, 77: 7323 ~ 7327

Badaeva E D, Friebe B, Gill B S, 1996. Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. Genome, 39: 1150 ~ 1158

Baldwin G B, Sanderson M J, Porter J M, 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Ann Miss Bot Gard, 82: 247 ~ 277

Cronn R C, Wendel J F, 1996. Polymorphism and concerted evolution in a tandemly repeated gene family: 5S ribosomal DNA in diploid and allopolyploid cottons. J Mol Evol, 42: 685 ~ 705

Cunado N, 1992. Analysis of metaphase Ⅰ chromosome association in species of the genus *Aegilops*. Theor Appl Genet, 85: 309 ~ 316

Dover G A, 1994. Concerted evolution, molecular drive and natural selection. Curr Biol, 4: 1165

Feldman M, 1965. Chromosome pairing between differential genomes in hybrids of tetraploid *Aegilops* species. Evolution, 19: 563 ~ 568

Felsenstein J, 1997. PHYLIP (phylogeny inference package). version 3.5c. Seattle: University of Washington

Grant V, 1981. Plant Speciation. 2nd ed. New York: Columbia University Press

Hillis D M, Moritz C, Porter C A, Baker R, 1991. Evidence for biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. Science, 251: 308 ~ 310

Hsiao C, Chatterton N J, Asay K H, 1995. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, *Triticeae* (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. Genome, 38: 211 ~

223

Kihara H, 1954. Consideration on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analyser method. Cytologia, 19: 336 ~ 357

Kimber G, Yen Y, 1989. Hybrids involving wheat relatives and autotetraploid *Triticum umbellulatum*. Genome, 32: 1 ~ 5

Kimber G, Zhao Y H, 1983. The D genome of the *Triticeae*. Can J Genet Cytol, 25: 581 ~ 589

Kimura M, 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol, 16: 111 ~ 120

Kong X-Y(孔秀英), Ge C-M(葛春民), Jia J-Z (贾继增), Dong Y-S(董玉琛), 1999. RAPD analysis of phylogeny for five basic genomes in *Aegilops*. Acta Bot Sin (植物学报), 41: 393 ~ 397

Masterson J, 1994. Stomatal size in fossil plant: evidence for polyploid in majority of angiosperms. Science, 264: 421 ~ 424

Sang T, Crawford D J, Stuessy T F, 1995. Documentation of reticulate evolution in *Paeonia* using ITS sequences of nuclear rDNA: Implication for biogeography and concerted evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 6813 ~ 6817

Sasanuma T, Miyasita N T, 1996. Wheat phylogeny determined by RFLP analysis of nuclear DNA. 3. Intra- and inter-specific variations of five *Aegilops* species. Theor Appl Genet, 92: 928 ~ 934

Song K M, Lu P, Tang K L, 1995. Rapid genome change in synthetic polyploids of *Brassica* and its implications for evolution. Proc Natl Acad Sci USA, 92: 7719 ~ 7723

Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucl Acids Res, 25: 4876 ~ 4882

Tsunewaki K, Mukai Y, Endo T R, Tsuji S, Murata M, 1976. Genetic diversity of the cytoplasm in *Triticum* and *Aegilops* Ⅴ. Classification of 23 cytoplasms into eight plasma types. Jpn J Genet, 15: 175 ~ 191

Wang J-B(王建波), Zhang W-J(张文驹), Chen J-K(陈家宽), 1999. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms. Acta Phytotax Sin (植物分类学报), 37: 407 ~ 416

Wang X-Q(汪小全), Hong D-Y(洪德元), 1997. Progress in molecular systematics of plants in recent five years. Acta Phytotax Sin (植物分类学报), 35: 465 ~ 480

Waters E R, Schaal B A, 1996. Biased gene conversion is not occurring among rDNA repeats in the *Brassica triangle*. Genome, 39: 150 ~ 154

Wen J, Zimmer E A, 1996. Phylogeny and biogeograph of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. Mol Phylogenet Evol, 6: 166 ~ 177

Wendel J F, Schnabel A, Seelanan T, 1995. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). Proc Natl Acad Sci USA, 92: 280 ~ 284

Zhang H B, Dvorak J, 1992. Diploid ancestry and evolution of *Triticum kotschyi* and *T. peregrinum* examined using variation in repeated nucleotide sequence. Genome, 35: 182 ~ 191

Zhao Y H, Kimber G, 1984. New hybrids with D genome wheat relatives. Genetics, 106: 509 ~ 515

（责任编辑 白羽红）